

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Campus Baixada Santista

EDUARDO HIROSHI MATSUO JUNIOR

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO
SOBRE A APOPTOSE DA MUSCULATURA
ESQUELÉTICA DE RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Santos

2013

EDUARDO HIROSHI MATSUO JUNIOR

EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE A APOPTOSE DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de São Paulo como parte dos
requisitos curriculares para obtenção do título de bacharel
em Educação Física – Modalidade Saúde.

Orientador: Profa. Dr.^a Alessandra Medeiros
Co-orientador: Prof. Dr.^o Daniel Araki Ribeiro

Santos

2013

EDUARDO HIROSHI MATSUO JUNIOR

EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE A APOPTOSE DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

Este exemplar corresponde à redação final do Trabalho de Conclusão de Curso defendido por nome do autor e aprovado pela Banca Examinadora em 18/02/2013.

Orientador: Profa. Dr.^a Alessandra Medeiros
Co-orientador: Prof. Dr.^o Daniel Araki Ribeiro

Santos

2013

Banca examinadora

Alessandra Medeiros

Profa. Dra.. Alessandra Medeiros
Orientadora

Wilson Max Almeida Monteiro de Moraes

Doutorando Wilson Max Almeida Monteiro de Moraes

Ricardo José Gomes

Prof. Dr ° Ricardo José Gomes

Dedicatória

Dedico não só este trabalho, mas a todo o ensinamento de vida que meus familiares e amigos prestaram à mim, em especial meu pai, Eduardo Hiroshi Matsuo (in memoriam) e minha mãe, Kazue Takagaki Matsuo.

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que fizeram parte da minha vida, que me ajudaram e ensinaram a superar todas as dificuldades e desafios já enfrentados.

Agradeço a minha orientadora professora Alessandra Medeiros, pois foi ela que confiou e deu total suporte para a realização deste trabalho. Muito obrigado pelas ajudas, conversas e conselhos.

Agradeço ao Luiz Henrique “Ike” pela companhia durante o trabalho que durou seis longos meses, foi muito bom trabalhar com você.

Agradeço imensamente as pessoas que colaboraram com este trabalho, Francine Carvalho, Gustavo Jesus, Guilherme, Livia Assis, Mariana Eiras, Renan Pozzi, pois sem estas pessoas o trabalho não seria realizado.

Agradeço ao meu co-orientador professor Drº Daniel Araki Ribeiro, por realizar minhas análises e disponibilizar o seu laboratório.

Agradeço a todos os docentes que fizeram parte da minha graduação, pela riqueza de conhecimentos aprendidos.

Agradeço meus amigos que moram comigo, pela convivência durante tantos anos, Banana, Mamá, Maritaca, Rodrigão e Tininga.

Por fim, agradeço imensamente a todos os meus colegas da faculdade, em especial a turma 4 pelos 4 anos vividos com muitas risadas e alegrias.

Muito Obrigado!

Epígrafe

Diante das dificuldades e desafios que a vida nos propõem muitas vezes o mundo parece conspirar para que a gente desista. Somos tentados a deixar para trás não apenas nossos sonhos, mas também pedaços de nós e de tudo em que acreditamos. Entretanto, para quem confia em dias melhores, esse é o momento exato para reerguer-se e lutar.

Não importa de onde venha a nossa força. O que interessa é buscar estímulos para seguir em frente e acreditar em Deus, superar obstáculos, batalhar pelos nossos ideais. O que precisamos é acreditar que tudo é possível quando cultivamos a esperança dentro de nós.

Milagres acontecem todos os dias, por toda a parte. Contudo, só os reconhece quem tem um coração repleto de fé e esperança. Quem se atreve a sonhar!

RESUMO

A hipertensão arterial é uma doença que está associada com alterações na musculatura esquelética, podendo existir fenótipos pró-apoptóticos que podem levar às disfunções deste órgão, trazendo sérios riscos e prejuízos à saúde, como fadiga excessiva e menor força e contratilidade. Sobre a apoptose, este evento é responsável pela morte celular programada, ou seja, ele regula o desaparecimento das células de forma ordenada e bem definida, sendo um evento essencial para a vida do ser humano. Porém, na hipertensão arterial, o evento apoptótico ocorre de maneira desordenada, ou seja, em excesso e causando prejuízos. Dessa forma, o presente estudo analisou o efeito do treinamento físico aeróbio sobre a apoptose na musculatura esquelética de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Neste estudo utilizamos 12 ratos SHR e 12 ratos Wistar-Kyoto (WKY), com oito semanas de vida. Estes foram divididos em quatro grupos, seis SHR – Treinados, seis SHR – Sedentários, seis WKY – Treinados, seis WKY – Sedentários. Os animais dos grupos treinados realizaram um protocolo de treinamento físico em esteira rolante durante 13 semanas, realizando sessões de 60 minutos, 5 vezes por semana, a uma intensidade de 55% do VO₂ máximo. Nesse mesmo período, em um dia que não era realizado o treinamento físico, eram feitas as coletas de dados da pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) de todos os animais, por meio da pletismografia caudal. Além dos parâmetros de PAS e FC, foram coletados os dados do teste de tolerância ao esforço físico progressivo, além das análises de genotoxicidade do DNA dos músculos esqueléticos sóleo e plantar. Em relação ao teste de tolerância ao esforço físico progressivo, os animais que realizaram o protocolo de treinamento físico, apresentaram resultados superiores em comparação aos grupos sedentários. Sobre os dados de PAS (pós treinamento) houve diferença estatística em comparação aos grupos WKY e SHR, já em relação aos tratamentos, os animais treinados obtiveram números mais acentuados em comparação aos animais sedentários, isso ocorreu para ambos os grupos. No teste de genotoxicidade dos músculos esqueléticos sóleo e plantar, os resultados mostraram que não houve diferenças entre os grupos. Por fim, podemos concluir que o treinamento físico foi eficaz aumentando a capacidade de esforço físico progressivo, e diminuindo a PAS (dos quais os valores pré estava mais elevados no grupo SHR). Em relação aos resultados de genotoxicidade dos músculos esqueléticos, não houve diferença significativa. Entretanto, como existem outros fatores específicos relacionados a hipertensão arterial e apoptose, antes da submissão do presente estudo para publicação, será realizada a análise de imunohistoquímica, para a quantificação das atividades das proteínas pró e anti apoptóticas, para uma possível validação dos resultados de genotoxicidade.

Palavras chaves: hipertensão arterial, exercício físico, músculo esquelético, apoptose.

Abstract

Cardiovascular diseases like hypertension are associated with a generalized skeletal myopathy including a proapoptotic phenotype, which can lead to serious organ dysfunctions, like excessive fatigue, reduced strength and contractility. The apoptosis is responsible for programmed cell death, in other words, it regulates the disappearance of cells in an order defined, so this event is essential for human life. However, apoptotic event in hypertension occurs disorderly, with a lot of cell death and causing tissues damage. So the present study examined the effect of aerobic exercise on apoptosis in skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats (SHR). Male normotensive rat (WKY) (Control, n=12), and of SHR rats (SHR=12), were assigned to a sedentary (SED) condition or exercise (EX) consisting of progressive treadmill running 5 days/week for 6 weeks, during 13 weeks at intensity of 55% VO_2 max. In the same period, one day that was not performed physical training, were made the data collection systolic blood pressure (SBP) and heart rate (HR) of all animals through plethysmography tail. Finally were analyzed the genotoxicity DNA of skeletal muscle soleus and plantaris. Test results of exercise tolerance progressive running, rats EX, were better than rats SED. About results data SBP and HR (post training) was no statistical difference in comparison groups, as compared to treatments rats EX had numbers more smaller that rats SED, this occurred for both groups. In the test for genotoxicity and soleus skeletal muscles grow, the results showed no effects between the groups. Finally, we conclude that exercise training was successful increasing the capacity of progressive physical effort on SBP and HR, the hypertensive animals reduced the values of these parameters, with a positive outcome related to hypertension, compared to the results of the genotoxicity skeletal muscles, there was no significant difference. However, as there are other specific factors related to hypertension and apoptosis, prior to submission for publication of this study will be performed immunohistochemical analysis for the quantification of the activities of pro-and anti apoptotic proteins for a possible validation of genotoxicity.

Keywords: hypertension, exercise training, skeletal muscle, apoptosis.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	10
1.1 - Apoptose e hipertensão arterial	12
2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1 – Amostra	17
2.2 - Cuidados éticos para com os procedimentos experimentais	17
2.3 - Avaliação da tolerância ao esforço físico progressivo	17
2.4 - Protocolo de treinamento físico aeróbico.....	18
2.5 - Determinação da capacidade aeróbia - medida do consumo de oxigênio.....	18
2.6 - Registro indireto da pressão arterial caudal e frequência cardíaca	19
2.7 - Procedimento de eutanásia	19
2.8 - Análise da genotoxicidade	20
3 - RESULTADOS.....	22
4 - DISCUSSÃO.....	28
5 - CONCLUSÃO	32
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS.....	41

1 – INTRODUÇÃO

A industrialização e urbanização formam um cenário repleto de tecnologias que nos induzem aos maus hábitos comportamentais, como a maior ingestão de alimentos calóricos e a diminuição da prática de atividade física (LEE, 2007; SHARMAN e STOWASSER, 2009). Esses fatores são propícios para desencadear doenças crônicas não transmissíveis, como as doenças cardiovasculares; dentre elas, a hipertensão arterial (PINTO, 2011).

A hipertensão arterial é definida como uma doença multifatorial, caracterizada pela elevada tensão produzida nas artérias (PINTO, 2011). Assim, o indivíduo com pressão arterial acima de 140 mmHg durante a fase da sístole, e/ou acima de 90 mmHg na fase da diástole, é considerado hipertenso. Essa pressão elevada promove um estresse hemodinâmico nos vasos, o que pode acarretar sérias alterações fisiológicas e/ou estruturais de órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins, vasos sanguíneos e músculo esquelético), e também alterações metabólicas, aumentando o risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (HERNANDEZ, 2008; QUADRILATERO e RUSH, 2008; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

Segundo Kumar (2005), existem dois tipos de hipertensão que são relevantes; a primária ou essencial, que geralmente não provoca complicações em curto prazo, especialmente quando controlada, sendo compatível ao longo da vida, permanecendo assintomática, a não ser que ocorra alguma complicação como um infarto do miocárdio (KUMAR, 2005). E a hipertensão secundária, causada por problemas nos rins ou nas adrenais, como a hipertensão renovascular. Ainda existe outra manifestação da hipertensão, que é fulminante e denominada de hipertensão maligna ou acelerada, causando graves problemas; esta é caracterizada pela rápida elevação na pressão arterial, e, quando não tratada, pode levar a morte dentro de um ou dois anos. Sabe-se que a genética (polimorfismo dos genes), a idade avançada e os maus hábitos comportamentais, como o tabagismo, etilismo e a má alimentação, agravam os riscos para desenvolver a hipertensão arterial essencial (CHOBANIAN, 2003; KUMAR, 2005; HAMILTON, 2007; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

Todos os anos a hipertensão é responsável pela morte de aproximadamente 7,6 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo responsável por 54% dos casos de acidente vascular encefálico (AVE) e 47% dos casos de infarto (fatais e não fatais). Fazendo o

levantamento dos últimos 10 anos, mais de 70 milhões de pessoas morreram por problemas decorrentes da hipertensão arterial. Ressaltando que 80% dos casos acontecem em países com baixo e médio desenvolvimento como o Brasil (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

Uma das hipóteses para a grande incidência da hipertensão arterial em países em desenvolvimento como o Brasil, é o baixo nível educacional. Firmo (2004), revelou em sua pesquisa que dos 919 voluntários, 23,4% desconheciam ser hipertensos. Sendo que 37,1% dos que tinham o conhecimento da doença, não estavam sendo tratados.

Além dos dados alarmantes com relação aos óbitos decorrentes da hipertensão arterial, essa doença acarreta altos gastos aos cofres do governo, devido a alta frequência de internações de pessoas com doenças cardiovasculares. O Sistema Único de Saúde (SUS) registrou em 2007, 1.157.509 de internações por doenças cardiovasculares, e em novembro de 2009 foram registradas 91.970 internações, com gastos diretos de R\$ 165.461.644,33. Diante dessa vulnerabilidade financeira e de acordo com o quadro crônico de longa duração, as doenças cardiovasculares necessitam de ações eficazes nos procedimentos dos serviços de saúde para prevenção e tratamento, pois resultam tanto em gastos diretos quanto indiretos aos cofres públicos, como, por exemplo, gastos ambulatoriais e gastos por aposentadoria precoce, respectivamente (BRASIL. Ministério da Saúde, 2005).

Para conter os gastos públicos e reduzir a incidência das doenças cardiovasculares, a maneira mais comumente adotada para a redução da pressão arterial é a abordagem clínica - farmacêutica. No entanto, estudos epidemiológicos mostram a forte relação entre hipertensão arterial (HASKELL, 2007; LEE, 2005; SHARMAN e STOWASSER, 2009) e a inatividade física, sendo, portanto, as mudanças para hábitos saudáveis de vida uma estratégia válida para a prevenção e tratamento. Assim, a atividade física tem mostrado ser um caminho eficaz no tratamento da hipertensão arterial (KENNEY, 2011; MONTEIRO, 2007; SCHLUTER, 2010). Estudos mostram que não é necessário fazer um exercício físico aeróbico intenso para resultar na diminuição efetiva da pressão arterial, pois apenas uma pequena elevação do nível da atividade física diária, pode alterar positivamente o nível da pressão arterial. Portanto, a efetividade da redução na pressão arterial pelo exercício físico pode ocorrer de maneira aguda ou crônica. A aguda pelo efeito da hipotensão pós-exercício, e a crônica devido ao treinamento físico planejado (KOKKINOS, 1995; LIRA, 2011; MONTEIRO, 2007). Segundo Hagberg (2000), o treinamento físico reduz de maneira significativa a pressão arterial de indivíduos hipertensos, sendo observada uma redução média de 11 e 8 mmHg nas pressões sistólicas e diastólica, respectivamente. Em

outro estudo de Hagberg (1983) mostrou que um treinamento físico em um período de um mês com adolescentes hipertensos, resultou na queda da pressão arterial sistólica (PAS), porém, após um mês da interrupção do treinamento, os valores da PAS tinham retornado aos níveis de pré-treinamento.

Outros pesquisadores têm estudado os mecanismos responsáveis pelo efeito hipotensor do exercício físico em humanos (hipertensos e não hipertensos) (CHEN, 2010; FITZGERALD, 1981; KENNE, 2011; KOKKINOS, 1995; MONTEIRO, 2007; SHARMAN e STOWASSER, 2009) e em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (OVERTON, 1988). Um dos mecanismos que explica a queda da pressão arterial por meio do treinamento físico aeróbio está relacionado à atenuação da atividade nervosa simpática (GAVA, 1995; LATERZA, 2007) e a melhora da sensibilidade barorreflexa arterial, a qual controla tanto a FC como a atividade nervosa simpática muscular (LATERZA, 2007). Demais estudos revelam que o treinamento físico tem a capacidade de modificar a estrutura do sistema circulatório (AMARAL, 2001; DINENNO, 2001), aumentando o fluxo sanguíneo, diminuindo a resistência vascular e aumentando a densidade venular (AMARAL, 2001), o que proporciona um melhor tempo do fluxo e da troca metabólica nos músculos (GUO, 2010). Fatores específicos como a diminuição da enzima conversora de angiotensina (ECA), que possui a função de elevar a pressão arterial e diminuir a angiogênese (GUO, 2010); o aumento do diâmetro da artéria, culminando na diminuição da relação parede/luz do vaso sanguíneo, também promovem benefícios na redução da pressão arterial (DINENNO, 2001).

O treinamento físico também traz efetividade na progressão da hipertensão arterial, devido ao aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico (DINENNO, 2001) e redução da hipertrofia cardíaca, o que contribui para a melhora da função cardíaca diastólica (estudos realizados com ratos SHR jovens) com a diminuição dos níveis circulantes das citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 (AGARWAL, 2009) e assim auxiliando na função endotelial (HIGASHI, 1999).

1.1 - Apoptose e hipertensão arterial

Outro problema importante observado na hipertensão arterial é a apoptose. Estudos realizados em ratos SHR têm demonstrado que esse modelo de hipertensão apresenta maior suscetibilidade a apoptose, apresentando alteração na expressão de proteínas e genes associados a apoptose no músculo liso da aorta (SHARIFI e SCHIFFRIN, 1998), em

arteríolas e capilares (VEJA, 1999), no coração (DIEZ, 1997; FORTUNO, 1998, 2003; RAVASSA, 2000; RODRIGUEZ-FEO, 2000), timo (SUZUKI, 1999), células mesangiais do rim (RODRIGUEZ-FEO, 2000) e no músculo esquelético (QUADRILATERO, 2006, 2008) quando comparados aos ratos Wistar-Kyoto (WKY), animais normotensos. Além do aumento de apoptose, a musculatura esquelética dos ratos SHR apresenta diversas outras alterações, como diminuição da resistência a fadiga (GRAY, 1994), desenvolvimento de menor força contrátil (ATRAKCHI, 1994; GRAY, 1994), alteração na bomba Na^+ e K^+ , diminuição da densidade capilar (BEN BACHIR-LAMRINI, 1990; KOBAYASHI, 2005) e redistribuição dos tipos de fibras. Todas essas alterações podem ser devido à modulação neuroendócrina diferenciada observada nos ratos SHR (QUADRILATERO, 2006).

Apoptose é a morte celular programada, caracterizada pelo desaparecimento das células, possuindo uma sequência bem definida das alterações morfológicas. Sendo um destino celular essencial para a vida, por exemplo: ela impede que nossas mãos possuam inter-digitações, que a cauda embrionária humana persista e que o cérebro fique com uma série de conexões inúteis (ALBERTS, 2004).

Resumidamente, as células que estão morrendo diminuem o volume e se condensam, e assim são fragmentadas em pequenos corpos apoptóticos ligados a membrana da célula; e por fim são absorvidos por outras células. Importante ressaltar que os constituintes intracelulares não são liberados para o meio extracelular, onde estes poderiam causar efeitos prejudiciais as células vizinhas (ALBERTS, 2004).

Os efetores do evento apoptótico são as caspases, formadas por um grupo de proteases (realizam proteólise), em resíduos cisteína (capacitando a clivagem em outras proteínas). Nos seres humanos existem 15 tipos de caspases, e para estas se tornarem ativas elas devem clivar umas as outras. No procedimento proteolítico da apoptose, esta clivagem é realizada repetidamente devido a existência de diferentes tipos de caspases, pois umas tem a capacidade de iniciar o processo, enquanto outras, terão o papel efetor, ou seja, ativar ou aumentar a atividade da morte celular programada (ALBERTS, 2004).

Para a ativação das vias das caspases, existem proteínas regulatórias transmembrana, sendo que 6 delas suprimem a apoptose e 9 promovem a apoptose. As proteínas fazem parte da família Bcl-2, em que a BAX induz e a Bcl-2 evitam o evento apoptótico. Elas atuam de acordo com o controle da liberação de proteínas mitocondriais, tais como o citocromo-C, que está localizado entre a membrana externa e interna da mitocôndria. Quando a célula está sofrendo apoptose, o citocromo-C é liberado no citosol. Esta liberação ocorre pela ligação da BAX (proteína pró-apotótica) na membrana; como consequência ela

forma canais homo-oligoméricos na membrana, que fazem a mediação do fluxo de íons, porém, este mecanismo ainda é desconhecido (ALBERTS, 2004).

Por fim, com a liberação do citocromo-C no citosol, ela se liga a proteína adaptadora Apaf-1 e promove uma cascata de ativação de caspases, levando a morte celular (ALBERTS, 2004).

Apesar de a apoptose ser um evento de regulação dos eventos fisiológicos, o excesso deste pode causar doenças neurodegenerativas (como o mal de Alzheimer e o mal de Parkinson), lesões secundárias após isquemia (bloqueio de circulação do sangue), retinite pigmentosa (uma causa de cegueira) e osteoporose (perda de massa óssea) (HORTA, 1999). Certas infecções também podem levar à apoptose excessiva, como o mal de Alzheimer, em que os neurônios parecem cometer suicídio. Em ataques cardíacos por isquemia, o bloqueio sanguíneo leva à necrose das células que dependem do vaso afetado (HORTA, 1999). Mas a destruição não termina, pois as células próximas da área afetada também morrem lentamente, e sua aparência sugere a ocorrência apoptótica (parece que o conteúdo tóxico das primeiras células mortas, quando não destrói as células vizinhas por necrose, as leva a apoptose) (HORTA, 1999).

Em indivíduos que possuem hipertensão arterial, foi citado que o evento apoptótico pode acometer órgãos como o músculo esquelético, causando uma série de alterações, já que estudos revelam a presença aumentada de restos celulares, com o aumento do número de macrófagos e vacúolos autofágicos, a perda do sarcolema indicando necrose; também foi analisado o aumento de fibras colágenas, o maior inchaço do sistema sarcotubular, o aumento de radicais livres e a atrofia das fibras musculares. Todas essas alterações podem levar a miopatia leve (enfraquecimento do músculo esquelético), e fibrose do músculo esquelético, os quais, de fato, são observados em ratos SHR (ADRAIN, 2001; HERNANDEZ, 2008; QUADRILATERO, 2008).

O estudo realizado por Quadrilatero, 2008, revelou que existe o aumento de apoptose devido a maior sinalização da via de caspases nos músculos sóleo (predominante fibras oxidativas) e o músculo gastrocnêmio (com fibras mistas oxidativas/glicolíticas e fibras glicolíticas) de ratos SHR quando comparados a ratos WKY. Os resultados foram confirmados pelos níveis elevados da fragmentação do DNA nos músculos esqueléticos dos ratos SHR, e, também, pelo aumento da proteína regulatória BAX, com a diminuição da proteína Bcl-2 (QUADRILATERO, 2008). Alguns mecanismos plausíveis podem explicar a elevação da fragmentação do DNA e a alteração das proteínas apoptóticas no músculo

esquelético de ratos SHR (QUADRILATERO, 2008). Recentemente, a apoptose no músculo esquelético tem sido demonstrada após a administração induzida de aldosterona (BURNISTON, J.G. *et al.*, 2005a), angiotensina II (BURNISTON, 2005b; SONG, 2005), catecolaminas (BURNISTON, 2004), e glicocorticóides (LEE, *et al.*, 2005). Curiosamente os ratos SHR demonstram que possuem níveis elevados de circulação de aldosterona (SOWERS, 1981), angiotensina II (MAKINO, 1999; SUGANO, 2000), e corticosterona (SOWERS, 1981), bem como elevados níveis de norepinefrina no músculo esquelético (CABASSI, 2002). Além disso, um estudo encontrou diminuição da densidade de micro-vasos e na rede capilar dos ratos SHR, em comparação aos ratos WKY, o que pode ser um mecanismo indireto para que ocorra a apoptose no músculo esquelético (KOBAYASHI, 2005),

Por outro lado, é sabido que o exercício físico é um estímulo fisiológico capaz de influenciar uma série de vias de sinalização extra ou intracelular, podendo influenciar de forma direta ou indireta os processos da apoptose no músculo esquelético. Em geral, um exercício físico agudo vigoroso está associado à fenótipos pró-apoptóticos e à fragmentação aumentada do DNA, ao passo que o exercício físico crônico, realizado regularmente está associado à regulação anti-apoptótica e a menor fragmentação do DNA no músculo esquelético. Entretanto, o efeito protetor do exercício físico regular tem sido observado em indivíduos saudáveis, induzidos por estresse, e em modelos de roedores doentes. Existem possíveis mecanismos para regular essa proteção, incluindo a expressão de proteínas anti e pró-apoptóticas, o aumento da biogênese mitocondrial, a melhoria da função mitocondrial, e a redução dos radicais livres (QUADRILATERO, 2011).

Apesar de evidências científicas sobre o efeito do exercício físico na diminuição da apoptose, o efeito do exercício físico nos ratos SHR ainda não é conhecido (QUADRILATERO, 2011). Diante o exposto, o problema será avaliado pelo treinamento físico aeróbio em órgãos específicos, como a musculatura esquelética.

Assim o objetivo do trabalho é analisar o efeito do treinamento físico aeróbico sobre a apoptose da musculatura esquelética de ratos SHR. Com os objetivos específicos, analisando:

- Tolerância ao esforço físico progressivo
- Pressão arterial sistólica e frequência cardíaca
- Genotoxicidade dos músculos sóleo e plantar

Justificando o trabalho pela busca de novas informações sobre o benefício do exercício físico em relação as doenças crônicas como a hipertensão arterial, que gera uma série de disfunções, por exemplo, a apoptose. Assim o contato com a pesquisa experimental,

viabilizou a realização do trabalho para produzir novas perspectivas sobre os temas do exercício físico e doenças crônicas. Dessa forma justifico o desejo de realizar este trabalho.

Além do mais o exercício físico pode gerar resultados que contribui para a diminuição da incidência das doenças crônicas degenerativas, como a hipertensão arterial. E atualmente a abordagem mais utilizada para atenuar a hipertensão arterial, é a clínica-farmacêutica, entretanto o exercício também aparece como estratégia válida. Porém este último vai além da diminuição os valores pressóricos, pois é um possível modulador da atenuação do aumento da apoptose. Podendo contribuir com a reversão da perda de função e massa muscular esquelética de indivíduos hipertensos.

A partir deste trabalho experimental, a possibilidade de gerar resultados positivos quanto ao exercício e a diminuição da apoptose na musculatura esquelética de ratos SHR, pode apresentar mais uma confirmação e ferramenta de trabalho para os educadores físicos. Pois se tratam de dois benefícios, a atenuação da hipertensão arterial e a diminuição da apoptose, que possivelmente altera o quadro de perda do rendimento de trabalho do músculo esquelético.

Assim a população em geral necessita ser conscientizada para a prática regular do exercício físico, como maneira de promoção e prevenção a saúde; melhorando a qualidade de vida. Sobre atenção específica sobre a hipertensão arterial, não deve ser dada a atenção plena pelo tratamento farmacológico, pois muitas das vezes ocorre o uso abusivo; portanto o exercício físico aparece como maneira acessível e eficaz ao combate as doenças crônicas degenerativas, como a hipertensão arterial e as suas consequências, assim como o aumento da apoptose em órgãos como o músculo esquelético.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho tem a abordagem de pesquisa experimental-quantitativa, pois, segundo Thomas e Nelson, 1996, trata da busca por explicações de comportamentos sobre a causa e efeito, assim foram utilizados recursos técnicos para resultarem em dados que foram analisados matematicamente.

2.1 – Amostra

Foram estudados ratos machos WKY e SHR provenientes da colônia do CEDEME da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP, com 8 semanas de idade no início do experimento, que permaneceram em gaiolas com quatro a seis animais, onde foram alimentados com dieta laboratorial padrão e água “ad libitum”. A temperatura ambiente foi mantida entre 22-23°C e foi adotado ciclo claro/escuro de 12 horas, com início do período escuro às 19h e início do período claro às 7h. Os ratos foram distribuídos em quatro grupos: ratos WKY sedentários (n=6), ratos WKY treinados (n=6), ratos SHR sedentários (n=6) e ratos SHR treinados (n=6). O presente estudo é um adendo (Anexo-A) de outro projeto, “Efeito do treinamento físico aeróbico na hipertrofia cardíaca de ratos SHR: papel do sistema ubiquitina proteassoma”. Sendo este último analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo (CEP N° 1576/11 – Anexo – B)

2.2 - Cuidados éticos para com os procedimentos experimentais

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos por pessoal treinado, estando de acordo com o Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996). Estando de acordo com protocolos de uso e eutanásia de animais “princípios de cuidados com animais de laboratório” (Committee on Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research) (UNITED STATES, 2003).

2.3 - Avaliação da tolerância ao esforço físico progressivo

Antes da realização do teste para avaliação da tolerância ao esforço físico progressivo, os animais foram submetidos a um período de adaptação ao exercício que consiste na prática da corrida durante 10 minutos, utilizando velocidades variadas, por três dias anteriores. Após essa etapa, os animais realizaram um teste progressivo até a exaustão utilizando protocolo com velocidade inicial de 5m/min, sendo intensificado a cada 3 minutos com velocidade de 5 m/min, até chegar o instante em que o animal não conseguiu manter o padrão de corrida. Este teste foi realizado no início, meio e fim do período de treinamento físico de 13 semanas (BROOKS e WHITE, 1978).

2.4 - Protocolo de treinamento físico aeróbico

Uma parte dos animais dos grupos WKY e SHR foram submetidos ao protocolo de treinamento físico (13 semanas) em esteira rolante, após a realização da determinação do consumo de oxigênio de pico (VO_2 pico), conforme descrito no próximo tópico (2.5). Na primeira semana do treinamento físico, os ratos treinaram em 30 % do VO_2 pico, durante 30 minutos. Nas três semanas seguintes, o tempo de duração foi de 40, 50 e 60 minutos, respectivamente, mantendo o consumo de 30% do VO_2 pico. A partir da quinta semana foi mantido o tempo de duração do treinamento, aumentando o consumo de oxigênio para 40, 50, 55% do VO_2 pico, repetindo este último valor nas seis semanas seguintes. Na metade do tempo de treinamento foi realizado o teste de esforço físico progressivo para o ajuste da intensidade do treinamento.

2.5 - Determinação da capacidade aeróbia - medida do consumo de oxigênio

A medida do consumo de oxigênio foi realizada em todos os ratos e consiste na utilização de uma caixa metabólica conectada a um analisador de gases capaz de fornecer a concentração de oxigênio no interior da mesma. Nesse estudo, foi utilizada uma caixa metabólica (9,5 x 32,5 x 11,5 cm) subdividida, internamente na sua porção superior (0,9 cm), por uma placa que possui 64 furos (0,3 cm de diâmetro) e que serve como uma câmara de mistura. A essa câmara foi conectado um tubo na forma de “Y” de onde parte da amostra foi retirada por uma bomba (FANEM, MOD. CAL) e, outra parte, com menor fluxo, foi retirada pela bomba do analisador de gases (Sable Systems Subsamplers Version 3, SS-3). A parte da frente da caixa possui uma abertura de 0,2 cm da superfície que permite a entrada de um fluxo de ar unidirecional sugado pelas bombas aspiradoras. Para a realização da medida do

consumo de oxigênio durante a realização do exercício físico, a caixa metabólica foi posicionada sobre uma esteira rolante, seguindo o protocolo de exercício físico progressivo até a exaustão, descrito a seguir.

2.6 - Registro indireto da pressão arterial caudal e frequência cardíaca

A medida indireta da pressão arterial caudal foi realizada pelo método de pletismografia de cauda, por meio de um sistema específico para ratos (Visitech, Inc, Apex, N.C.), o qual é composta por duas caixas restritoras (3 cm de largura e 3,3 cm de altura) montadas sobre uma plataforma aquecida (36°C). Essa medida foi realizada uma vez por semana, no dia que os animais dos grupos treinados não foram submetidos ao treinamento físico, com o objetivo de avaliar se o protocolo de treinamento físico utilizado reduz a pressão arterial e/ou a frequência cardíaca de repouso dos animais SHR. A cauda dos animais foi colocada através dos manguitos e sendo fixada com fita adesiva entre a fonte de luz e o fotorresistor, aos quais estão localizados acima e abaixo da cauda, respectivamente. Avaliado fotoeletricamente, o fluxo sanguíneo da cauda produzirá ondas oscilatórias que serão digitalmente mostradas 200 vezes por segundo por canal, e analisadas antes e durante uma rotina programável de inflagem e desinflagem (240 mmHg e 0 mmHg, respectivamente) do manguito. Os valores pressão arterial sistólica, diastólica e média caudal e frequência cardíaca de repouso serão obtidos após cada rotina do equipamento. Para a determinação da pressão arterial caudal e frequência cardíaca de repouso serão consideradas as médias de seis registros realizados no mesmo dia. Cabe ressaltar que na semana anterior ao início do protocolo experimental, todos os animais foram adaptados ao sistema durante três dias consecutivos, durante 10 minutos por dia, com o aquecimento da plataforma com temperaturas entre 33-36°C e com inflagem do manguito até a pressão de 180 mmHg.

2.7 - Procedimento de eutanásia

Os animais que foram utilizados para realização das análises biomoleculares dos músculos esqueléticos (músculo sóleo e plantar), foram sacrificados vinte e quatro horas após a realização da última sessão de treinamento físico dos grupos treinados. Esses animais foram anestesiados com uretana (1,2 g.kg, *i.v.*, Sigma, MO, USA) 0,3ml para cada 100g do peso corporal do animal. Em seguida foi realizada a excisão dos músculos esqueléticos para subsequente pesagem e posterior processamento molecular. Os músculos esqueléticos foram

separados e pesados (em uma balança de precisão). Logo em seguida os músculos foram armazenados em tubos imersos no nitrogênio líquido (aproximadamente -180°C).

2.8 - Análise da genotoxicidade

2.8.1 - Teste de células individualizadas em gel de agarose (teste do cometa)

O protocolo do teste do cometa utilizado para células dos músculos esqueléticos (músculo sóleo e plantar), segue as orientações propostas por Tice *et al.* (2000) com algumas modificações. Fragmentos centrais desses órgãos foram coletados e macerados em 0,9% NaCl utilizando espátula de madeira. As suspensões resultantes foram centrifugadas a 800 rpm durante 5 min e adicionado a 120µL de baixo ponto de fusão agarose (0,5%) a 37°C, e recobertos por lamínula. Após breve solidificação no refrigerador convencional, a lamínula, será removida, sendo as lâminas então imersas em solução lise contendo 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM de tampão Tris-HCl, pH 10, 1% de sódio sarcosinate com 1% Triton X-100 e 10% DMSO, durante no mínimo 1h. Antes de eletroforese, as lâminas permaneceram em repouso em solução tampão alcalina (pH> 13) por 20 min, seguida por 20 min eletroforese a 0,7 V / cm, 300mA. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com solução tampão 0,4 M Tris-HCl (pH 7,5), fixadas em etanol absoluto e armazenadas até análise. O DNA foi corado pela adição de 100 µL de brometo de etídio (50 µg/mL) para cada lâmina. A fim de minimizar adicionais danos ao DNA a partir da radiação ultravioleta, todos os passos foram conduzidos com iluminação reduzida. Controles positivos independentes a partir de células de sangue periférico, fígado, cérebro e coração serão gerados in vitro com 10 µg/mL MMS (metilmetasulfonato) por 30 min a 37° C, a fim de garantir a reprodutibilidade e sensibilidade do ensaio.

2.8.2 - Captação de cometas e análises

Um total de 50 cometas foram capturados aleatoriamente por animal (25 células de cada lâmina) sendo analisadas por um observador especializado a 400X ampliação, utilizando um microscópio (Olympus) conectado através de uma câmera preto e branco a um sistema de análise de imagem (Comet Assay II, Perspective Instruments Suffolk, Haverhill, UK), anteriormente calibrado de acordo com instruções do fabricante. O sistema de análise de imagem computadorizada adquire imagens, calcula a intensidade integrada para os perfis de

cada célula, bem como as estimativas do cometa aos componentes celulares e, em seguida, avalia a gama de parâmetros derivados. Células incólumes possuem um núcleo intacto, sem cauda e células lesadas com a aparência de um cometa. Para medir os danos no DNA, dois parâmetros de análise do sistema de imagem foram considerados: intensidade da cauda (% DNA presente na cauda dos cometas) e momento da cauda (o produto do comprimento da cauda e da fração de DNA na cauda do cometa).

2.8.3 - Análise dos resultados

Para avaliar o efeito do Grupo e Tratamento no tempo, sobre as variáveis-resposta de PAS, FC e teste tolerância ao esforço físico, empregou-se o modelo linear generalizado e o método de comparações múltiplas de Bonferroni; sobre as análises de gentoxicidade empregou-se o modelo de análise de variância com 2 fatores fixos. Os dados obtidos nesse estudo serão apresentados como média \pm erro padrão da média e comparados por meio da análise de variância (ANOVA) de 2 vias, utilizando-se post-hoc de Duncan. Para todas as análises foi adotado como nível de significância $p < 0,05$ (MCCULLAGH, 1989; NETER, 1996)

3 - RESULTADOS

Na tabela 1 estão descritos os valores dos testes de tolerância ao esforço físico progressivo dos grupos SHR e WKY, lembrando que os dados estão expressos pelo tempo, na unidade de medida em segundos. De acordo com a tabela 1 e figura 1, pode-se verificar que os grupos que realizaram o protocolo de treinamento físico apresentaram maior tolerância ao esforço físico progressivo, em comparação aos seus respectivos grupos Sedentários. Ressaltando que o grupo WKY teve uma melhora mais acentuada que o grupo SHR.

Tabela 1: Medidas descritivas do teste de esforço físico progressivo.

Avaliação	Grupos	Tratamento	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Pré	WKY	Sedentário	773,33	164,50	628	1089
		Treinado	779,33	229,23	551	1104
	SHR	Sedentário	1139,66	141,53	933	1372
		Treinado	1145,83	217,58	762	1357
Pós	WKY	Sedentário	604,66	179,49	310	820
		Treinado @\$	1317,33	233,98	990	1390
	SHR	Sedentário	1009,5	138,33	795	1140
		Treinado &*	1339,16	70,15	1277	1474

Legenda: Dados apresentados em média±desvio padrão, com avaliações pré e pós o treinamento físico, referentes a 6 ratos por grupo. Os valores estão expressos na unidade de medida de tempo em segundos. Os valores estão expressos em segundos (seg). \$ p<0,05 vs WKY sedentário (pós); & p<0,05 vs SHR sedentário (pós); * p<0,05 vs respectivo pré; @ p<0,05 vs respectivo pré.

Teste – Tolerância ao esforço físico

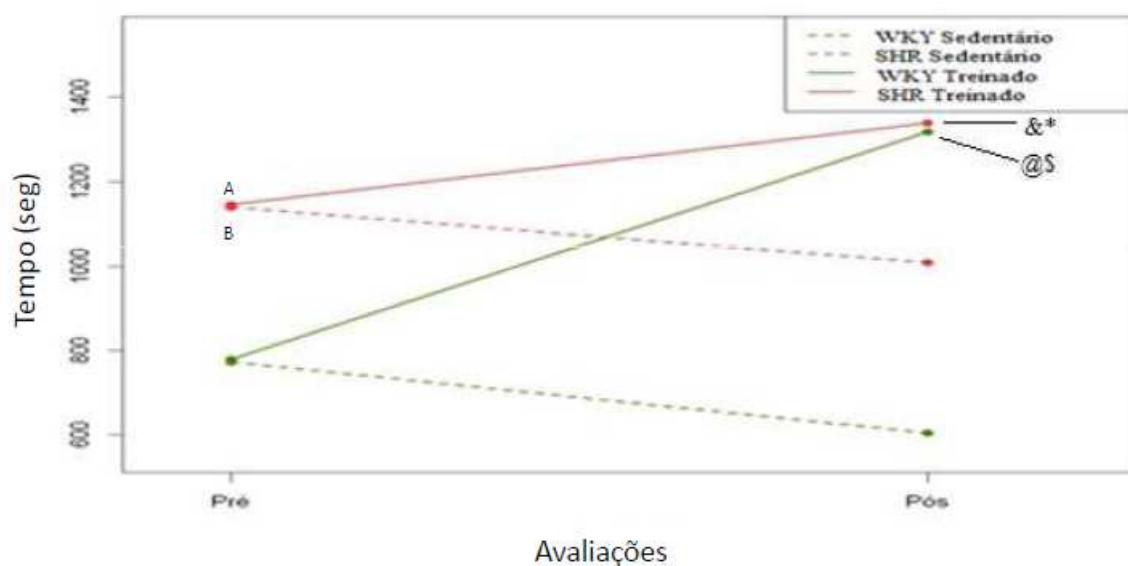


Figura 1: Teste de tolerância ao esforço físico nos ratos WKY-Sedentários (CS, n=6), WKY-Treinados (CT, n=6), SHR-Sedentários (HS, n=6) e SHR-Treinados (HT, n=6), pré (PRÉ) e pós (PÓS) período experimental. Os valores estão expressos na unidade de medida de tempo em segundos. Os valores estão expressos em segundos (seg). A p<0,05 vs WKY treinado (pre); B p<0,05 WKY sedentario (pre); \$ p<0,05 vs WKY sedentário (pós); & p<0,05 vs SHR sedentário (pós); * p<0,05 vs respectivo pré; @ p<0,05 vs respectivo pré.

Na tabela 2 estão descritos os valores da PAS dos grupos SHR e WKY, referente ao resultado das análises de medida da pressão arterial por pletismografia caudal. Os dados da PAS estão expressos em milímetros de mercúrio (mmHg) onde são apresentados a média e desvio padrão, além dos valores mínimos e máximos obtidos em cada grupo. Com base na tabela 2 e figura 2, pode-se afirmar que existe diferença estatística entre os valores de PAS entre os grupos WKY e SHR, onde o grupo WKY apresenta menores valores quando comparado ao grupo SHR, tanto no momento pré-Treinamento Físico quanto no momento pós-Treinamento Físico. Na comparação entre os tratamentos o grupo SHR-Treinado apresentou diminuição significativa da PAS quando comparado ao grupo SHR-Sedentário.

Tabela 2: Medidas descritivas da variável Pressão Arterial Sistólica.

Avaliação	Grupos	Tratamento	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Pré	WKY	Sedentário	141,93	9,20	135,33	159,83
		Treinado	160,87	6,93	151,70	168,80
	SHR	Sedentário	192,20	15,19	174,29	212,50
		Treinado	193,22	19,53	168,50	213,00
Pós	WKY	Sedentário	139,46	8,64	128,60	151,44
		Treinado	135,37	11,50	123,80	152,90
	SHR	Sedentário #	196,26	8,77	185,80	206,88
		Treinado %&	169,69	12,55	151,71	185,90

Legenda: Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, referente a 6 ratos por grupo. Todos os valores descritos são expressos por milímetros de mercúrio (mmHg). # $p < 0,05$ vs WKY sedentário (pós), % $p < 0,05$ vs WKY treinado (pós); & $p < 0,05$ vs SHR sedentário (pós).

Figura 2: Distribuição da variável Pressão Arterial Sistólica (PAS), segundo cada grupo e tempo formado.

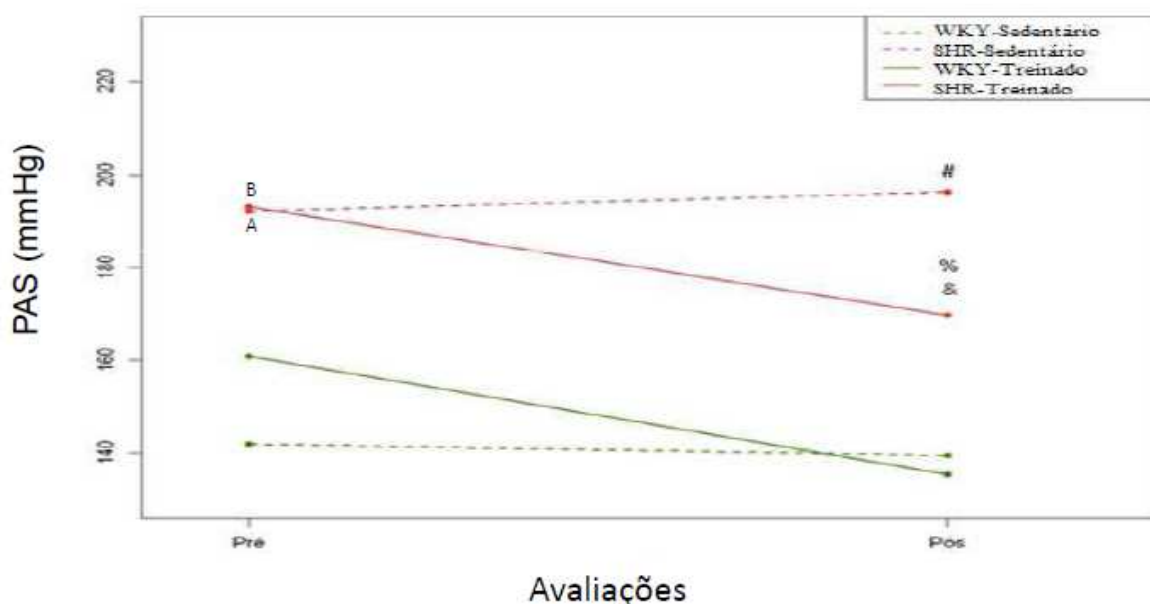


Figura 2: Pressão Arterial Sistólica de repouso dos ratos WKY-Sedentário (n=6), WKY-Treinado (n=6), SHR-Sedentário (n=6) e SHR-Treinado (n=6), pré e pós período experimental. Os valores estão expressos em milímetros de mercúrio (mmHg). A $p < 0,05$ vs WKY treinado (pre); B $p < 0,05$ WKY sedentário (pre); # $p < 0,05$ vs WKY sedentário (pós), % $p < 0,05$ vs WKY treinado (pós); & $p < 0,05$ vs SHR sedentário (pós).

Na tabela 3, estão descritos os valores de FC dos grupos SHR e WKY, de ambos os tratamentos (sedentário e treinado), analisados por pletismografia caudal. Os dados de FC estão expressos em batimentos por minuto (bpm), onde estão apresentados a média e desvio padrão, além dos valores mínimos e máximos obtidos em cada grupo. Os dados apresentados na tabela 3 e na figura 3, permitem dizer que o grupo WKY apresentou menor FC quando comparado ao grupo SHR, tanto no momento pré-Treinamento Físico quanto no momento pós-Treinamento Físico. Na comparação entre os tratamentos, os ratos treinados obtiveram, menores de FC quando comparados aos respectivos sedentários.

Tabela 3: Medidas descritivas da variável Frequência Cardíaca.

Avaliação	Grupos	Tratamento	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Pré	WKY	Sedentário	351,15	23,52	320,00	375,88
		Treinado	355,29	27,01	324,50	397,30
	SHR	Sedentário	418,83	44,08	348,40	484,75
		Treinado	398,10	31,74	360,28	445,80
Pós	WKY	Sedentário	349,13	28,09	314,75	386,50
		Treinado	327,99	16,78	311,40	355,00
	SHR	Sedentário #	376,92	27,17	352,00	414,00
		Treinado %	371,34	26,88	337,67	409,00

Legenda: Dados apresentados em média \pm desvio-padrão, referente a 6 ratos por grupo. Todos os valores descritos são expressos por batimentos por minuto (bpm). # $p < 0,05$ vs WKY sedentário (pós); % $p < 0,05$ vs WKY treinado (pós).

Figura 3: Distribuição da variável Frequência Cardíaca (FC), segundo cada grupo e tempo formado.

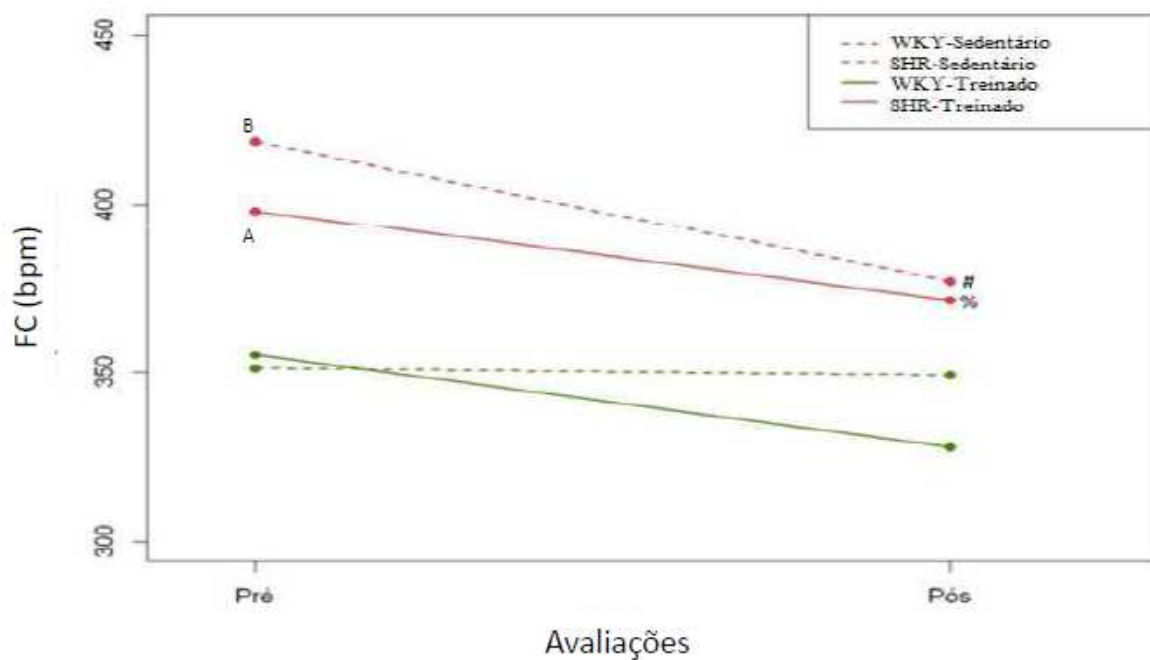


Figura 3: Frequência Cardíaca de repouso dos ratos WKY-Sedentário (n=6), WKY-Treinado (n=6), SHR-Sedentário (n=6) e SHR-Treinado (n=6), pré e pós período experimental. Os valores estão expressos em batimentos por minuto (bpm). A $p < 0,05$ vs WKY treinado (pre); B $p < 0,05$ WKY sedentário (pre); # $p < 0,05$ vs WKY sedentário (pós); % $p < 0,05$ vs WKY treinado (pós).

Na tabela 4 e figura 4 estão apresentados os valores de danos genotóxicos no DNA do músculo esquelético sóleo, sendo expressos pelo tamanho da cauda dos cometas em unidades arbitrárias, permitindo dizer que não há diferenças estatísticas entre os Grupos e Tratamentos.

Tabela 4: Medidas descritivas da variável Cometa - Músculo Sóleo.

Grupos	Tratamento	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
WKY	Sedentário	0,68	0,22	0,40	0,90
	Treinado	0,93	0,34	0,50	1,20
SHR	Sedentário	0,78	0,31	0,50	1,20
	Treinado	0,83	0,46	0,50	1,50

Legenda: Dados apresentados em média \pm desvio padrão, referente a 3 animais por tratamento. Os valores descritos são expressos pelos momentos da cauda dos cometas (em unidades arbitrárias).

Figura 4 – Avaliação da Genotoxicidade – Músculo Sóleo

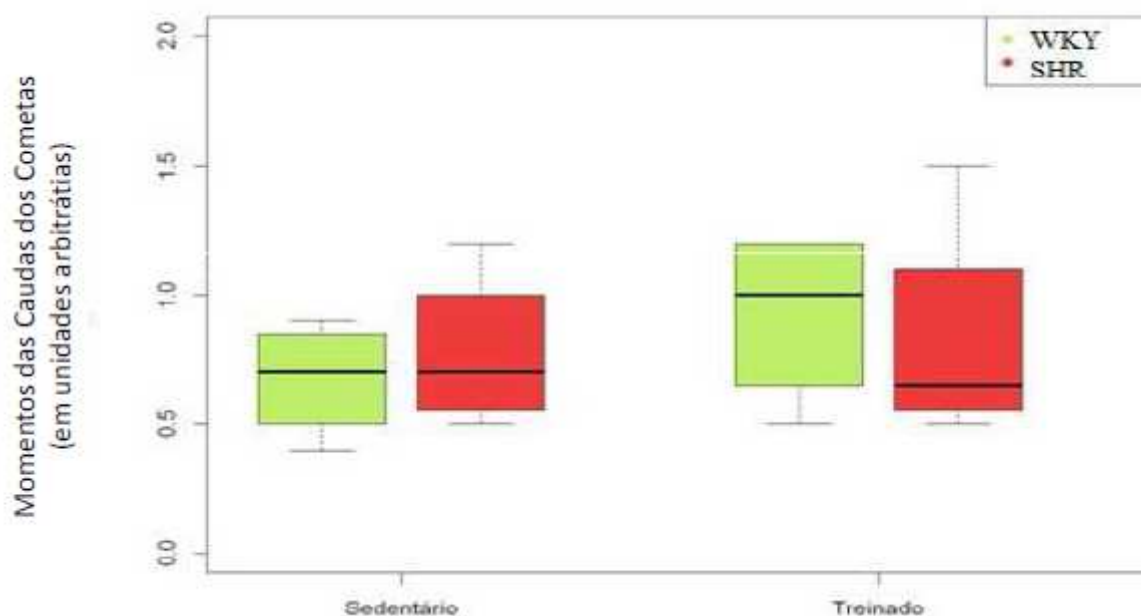


Figura 4: Apoptose avaliada por teste do cometa nos músculos sóleo dos ratos WKY-Sedentário (n=3), WKY-Treinado (n=3), SHR-Sedentário (n=3) e SHR-Treinado (n=3), pré e pós período experimental.

Na tabela 5 e figura 5 estão descritos os valores de danos genotóxicos no DNA do músculo esquelético plantar, sendo expressos pelo tamanho da cauda dos cometas em unidades arbitrárias, permitindo dizer que não há diferenças estatísticas entre os Grupos e Tratamentos.

Tabela 5: Medidas descritivas da variável Cometa - Músculo Plantar.

Grupos	Tratamento	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
WKY	Sedentário	0,53	0,19	0,40	0,80
	Treinado	0,53	0,28	0,20	0,80
SHR	Sedentário	0,70	0,57	0,20	1,50
	Treinado	0,98	0,43	0,50	1,50

Legenda: Dados apresentados em média \pm desvio padrão, referente a 6 animais por tratamento. Os valores descritos são expressos pelos momentos da cauda dos cometas (em unidades arbitrárias).

Figura 5 – Avaliação da Genotoxicidade – Músculo Plantar.

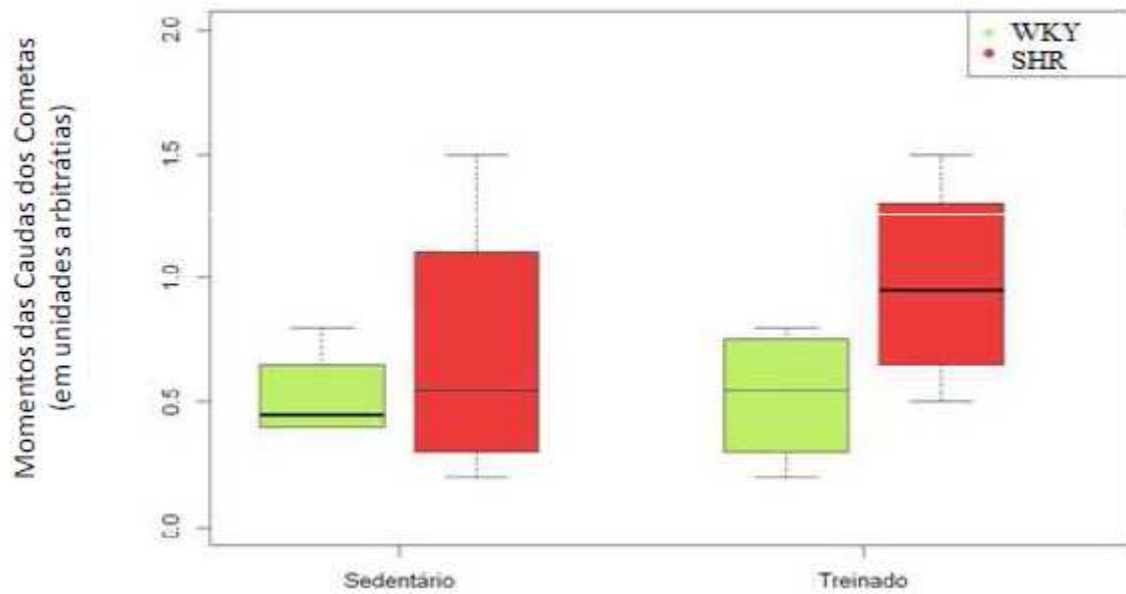


Figura 5: Apoptose avaliada por teste do cometa no músculo plantar dos ratos WKY-Sedentário (n=3), WKY-Treinado (n=3), SHR-Sedentário (n=3) e SHR-Treinado (n=3), pré e pós período experimental

4 - DISCUSSÃO

Na literatura, muitos estudos com modelos experimentais demonstram que os ratos SHR apresentam maior suscetibilidade para apoptose, resultando em alterações em diversas estruturas do nosso organismo, como no coração (DIEZ, 1997; FORTUNO, 1998, 2003; RAVASSA, 2000; RODRIGUEZ-FEO, 2000), nas arteríolas e capilares (VEJA, 1999), nos rins (RODRIGUEZ-FEO, 2000) e na musculatura esquelética (QUADRILATERO, 2006, 2008). No entanto, o exercício físico aparece como um estímulo que oferece proteção contra o excesso de apoptose, por meio de alterações nas sinalizações celulares e em alterações morfológicas (QUADRILATERO, 2011).

Dessa forma, o presente estudo analisou os danos genotóxicos no DNA da musculatura esquelética de ratos SHR após a realização de um protocolo de treinamento físico, o qual também observou os resultados sobre a tolerância ao esforço físico progressivo, os valores de PAS e FC.

Diante do exposto, para os animais treinados foram obtidos resultados positivos nos testes de tolerância ao esforço físico progressivo em esteira rolante, sendo um marcador importante para a plenitude deste trabalho. A eficácia do teste pode ser confirmada pelo efeito benéfico do treinamento físico de baixa intensidade, em que autores como Gava, (1995), Vêras-Silva, (1997), confirmam o aumento do VO_2 máximo após o período de treinamento físico semelhante ao deste trabalho (com diferença apenas no tempo de protocolo, para 18 semanas). Essa melhora do condicionamento físico está relacionada à adaptações morfológicas e fisiológicas que ocorrem em órgãos como o músculo cardíaco e esquelético, além de alterações como o aumento das enzimas oxidativas deste último (FERNANDEZ, 2012; NEGRÃO, 2010). Nessa perspectiva, a somatória de todas as alterações traz melhorias para rendimento físico, no que se refere ao melhor trabalho da bomba cardíaca, o coração, além de todas as adaptações cardiorrespiratórias e da função muscular-esquelética.

Quanto aos valores de PAS, destacamos que os níveis pressóricos dos animais SHR deste trabalho eram mais elevados em comparação aos WKY (mesmo com o ligeiro aumento no valor da PAS dos animais WKY provenientes do CEDEME da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP). Entretanto, após o período de treinamento físico os valores de pressão arterial dos animais treinados eram menores em comparação aos sedentários. Em síntese, as reduções dos valores basais de PAS corroboraram outros estudos que também evidenciaram o mesmo comportamento da diminuição deste parâmetro, diante de protocolos de exercícios físicos semelhantes. No estudo de Vêras-Silva (1997), o qual foi utilizado um protocolo de

treinamento semelhante ao utilizado neste estudo, observou-se que a PAS foi reduzida em 14 mmHg nos ratos SHR, já no trabalho de Fernandez (2012), que realizou um protocolo com ratos SHR treinados com natação com características de baixa/moderada intensidade, obteve-se resultados de redução da PAS ainda mais significativos (SHR-Treinado: $162 \pm 4,4$ mmHg vs SHR-Sedentário: $207 \pm 5,5$ mmHg). Desse modo, mesmo com diferentes protocolos e tipos de exercícios físicos é possível confirmar que o exercício físico considerado de baixa/moderada intensidade em modelos experimentais são eficientes para redução da pressão arterial. Além disso, também existem trabalhos realizados com seres humanos hipertensos que também mostram a relação do exercício físico com o efeito hipotensor (CHEN, 2010; FITZGERALD, 1981; KENNE, 2011; KOKKINOS, 1995; MONTEIRO, 2007; SHARMAN e STOWASSER, 2009).

A partir do pressuposto, são destacadas diversas alterações que podem colaborar na redução dos níveis pressóricos a partir do efeito do treinamento físico, como o aumento da rede microvascular (AMARAL, 2001; MELO, 2003), a redução na resistência da microcirculação do músculo esquelético (AMARAL, 2000), a diminuição da relação parede/luz do vaso (DINENNO, 2001; MELO, 2003), o aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico (DINENNO, 2001), a menor liberação de ECA (GUO, 2010), redução do tônus simpático no sistema cardiovascular (NEGRÃO, 2010) e redução da hipertrofia cardíaca (ARGAWAL, 2009). Ou seja, todas estão relacionadas com alterações morfológicas ou funcionais.

Observando os resultados da FC, destacam-se os valores pós do grupo de animais treinados, em que os valores dos SHR-Treinados passaram de 391,8 bpm para 371,34 bpm, bem como os WKY-Treinados, de 355,29 bpm passaram para 327,99 bpm, lembrando que os valores da FC dos ratos SHR sempre foram superiores aos animais WKY. Para reforçar estes resultados, Melo (2003) alcançou um resultado semelhante, com os SHR-Treinados: 355 ± 15 bpm x SHR-Sedentários: 395 ± 13 bpm; WKY-Treinados: 387 ± 10 bpm x WKY-Sedentários: 368 ± 12 bpm; assim como Vêras-Silva (1997) encontrou resultados para WKY-Treinados: 318 ± 8 x WKY-Sedentários: 359 ± 9 bpm.

Destacando os resultados da FC para os dois grupos, os mecanismos envolvidos por esse fenômeno são distintos, pois em ratos SHR Treinados está relacionada a redução do tônus vagal do coração, com a tendência da FC se aproximar dos valores dos ratos WKY. Já nos ratos WKY, acontece outra alteração sobre a redução dos valores da FC, em que ocorrem alterações da FC intrínseca (marcapasso cardíaco), ou seja, esta é denominada bradicardia de repouso (NEGRÃO, 2000; VÉRAS-SILVA, 1997). A partir desse pressuposto podemos

inferir que com a diminuição do ritmo cardíaco dos ratos SHR, também ocorre redução do DC, pois $DC = FC \times \text{Volume Sistólico}$, ou seja, consequentemente a PAM também reduz ($PAM = DC \times \text{Resistência Vascular Periférica}$), sendo um determinante importante para a redução dos níveis pressóricos (NEGRÃO, 2010). Vale lembrar que a redução da FC de repouso, tanto para os ratos SHR e WKY, são marcadores relevantes para a eficiência do protocolo de exercício físico, assim como foi observado nos testes de tolerância ao esforço físico progressivo (LIN, 1972; NEGRÃO, 1992; VÉRAS-SILVA, 1997).

Retomando as evidências na redução da PAS, FC e o teste de tolerância ao esforço físico progressivo, seria plausível afirmar que podem ocorrer alterações benéficas nos sistemas centrais e periféricos que são afetados pelos elevados níveis pressóricos, como por exemplo, no músculo esquelético tal qual é acometido pelo enfraquecimento, atrofia, aumento dos radicais livres e apoptose (HERNANDEZ, 2008; QUADRILATERO, 2008).

Entretanto, os resultados de genotoxicidade (teste do cometa) dos músculos esqueléticos sóleo e plantar mostram que houve apenas uma pequena diferença nos valores entre os grupos, porém não significativa. Em contrapartida, McMillan (2012), analisou o efeito da fragmentação do DNA no músculo sóleo após a realização de um protocolo que treinamento físico em esteira rolante, o que revelou 57% de fragmentação de DNA mais elevada para ratos SHR-Sedentários em comparação aos WKY-Sedentários. Já os valores entre os animais SHR-Treinados e WKY-Treinados não houve diferença, no entanto, a fragmentação do DNA no grupo SHR-Treinado foi menor em comparação ao grupo SHR-Sedentário. Assim como o trabalho de Song, W. (2006). que obtiveram resultados de menor fragmentação do DNA após o treinamento físico. Entretanto vale ressaltar que ambos os trabalhos utilizaram ratos idosos, o que pode influenciar nos resultados, já que no animal SHR apresenta maiores comprometimentos no músculo esquelético quando idosos.

Todavia, outro ponto que precisa ser ressaltado é o método para análise da fragmentação do DNA nos estudos de McMillan (2012) e Song, W. (2006) foi diferente ao utilizado neste trabalho, de modo que foi realizado através de um kit de detecção de morte celular (ELISA), em que um espectofotômetro faz a leitura da absorbância das proteínas relacionadas a fragmentação do DNA, fato que pode resultar em resultados diferentes. Outro fator para que os resultados entre os trabalhos sejam distintos, seria quanto o número de amostras utilizado no trabalho de McMillan (2012), sendo analisados 12 animais por grupo, enquanto o presente estudo analisou três animais por grupo.

Em suma, existem outros fatores específicos quanto a análise para apoptose, portanto, antes da submissão do presente estudo para publicação, será realizada a análise das

atividades das proteínas pró e anti apoptóticas, de maneira que possa dar validade ao resultado da não diferença de genotoxicidade entre os grupos SHR e WKY (dados ainda não coletados).

5 - CONCLUSÃO

Diante dos nossos resultados, podemos afirmar que o protocolo de treinamento físico aeróbio foi eficaz, aumentando a tolerância ao esforço físico e diminuindo os valores pressóricos e FC de repouso dos animais SHR. Nessa perspectiva, fica evidente que o exercício físico aeróbio é uma importante ferramenta não farmacológica no combate a hipertensão.

Sobre as análises de apoptose, não obtivemos diferença entre os tratamentos nas análises de genotoxicidade dos músculos esqueléticos sóleo e plantar. Entretanto, como existem outros fatores específicos relacionados a hipertensão arterial e apoptose, antes da submissão do presente estudo para publicação, será realizada a análise de imunohistoquímica, para a quantificação das atividades das proteínas pró e anti apoptóticas, para uma possível validação dos resultados de genotoxicidade. Além de outra realização do teste de genotoxicidade do DNA dos músculos esqueléticos sóleo e plantar, assim aumentando o número de amostras.

Por fim, deixamos a ressalva sobre recentes publicações em a relação apoptose, hipertensão e exercício físico, de maneira que é necessário realizar mais estudos detalhados com outros tipos de análises e protocolos de treinamento físico para garantir uma produção científica de conhecimentos sobre este assunto.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRAIN, C.; CREAGH, E. M.; MARTIN, S. J. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. **The Embo Journal**, Heidelberg, v. 20, n. 23, p. 6627-6636, dec. 2001.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726499> >. Acessado em 20/03/2012.

AGARWAL, D. *et al.* Role of proinflammatory cytokines and redox homeostasis in exercise-induced delayed progression of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, Baton Rougev, v. 54, n. 6, p. 1393-1400, dec. 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19841289> >. Acessado em 07/03/2012.

ALBERTS, A. W. P. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

AMARAL, S. L. *et al.* Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, São Paulo, v. 19, n. 5, p. 931-940, may 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11393677> >. Acessado em 20/03/2012.

AMARAL, S.L.; ZORN, T.M.; MICHELINI, L.C. Exercise Training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. **Journal fo Hypertension**, São Paulo, v. 18, n. 11, p. 1563-1572, Nov 2000. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11081768>>. Acessado em 22/01/2013.

ATRAKCHI, A.; GRAY, S. D.; CARLSEN, R. C. Development of soleus muscles in SHR: relationship of muscle deficits to rise in blood pressure. **American Journal of Physiology**, Davis, v. 267, n. 3, p. 827-835, sept. 1994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7943210> >. Acessado em 20/03/2012.

BEN BACHIR-LAMRINI, L. *et al.* Evidence of a slow-to-fast fiber type transition in skeletal muscle from spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology**, Lyon, v. 258, n. 2, p. 352-357, feb. 1990. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2309928> >. Acessado em 07/03/2012.

BRADFORD, M. A. rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the princípie of protein-dye binding. **Anal Biochemitry**, Athens, v. 72, n.1-2, p. 248-254, may 1976. Disponível em:< <http://libra.msra.cn/Publication/36389781/a-rapid-and-sensitive-method-for-the-quantitation-of-microgram-quantities-of-protein-utilizing-the>>. Acessado em 08/03/2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **A VIGILÂNCIA , O CONTROLE E A PREVENÇÃO DAS DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS. DCNT NO CONTEXTO DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE BRASILEIRO – Situação e Desafios Atuais . ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE 2005.** Disponível em: < <http://www2.datasus.gov.br> >. Acessado em 11/07/2012.

BROOKS, G. A.; WHITE, T. P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **Journal Applied of Physiology**, Berkeley, v. 45, n. 6, p. 1009-1015, dec. 1978. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/730582> >. Acessado em 07/03/2012.

BURNISTON, J. G. *et al.* Aldosterone induces myocyte apoptosis in the heart and skeletal muscles of rats in vivo. **Jounal of Molecular and Cellular Cardiology**, Liverpool, v. 39, n. 2, p. 395-399, aug. 2005a. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15907929> >. Acessado em 20/03/2012.

BURNISTON, J. G. *et al.* Angiotensin II induces apoptosis in vivo in skeletal, as well as cardiac, muscle of the rat. **Experimental Physiology**, Liverpool, v. 90, n. 5, p. 755-761, sept. 2005b. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987733> >. Acessado em 20/03/2012.

BURNISTON, J. G. α 2-Adrenergic receptor stimulation in vivo induces apoptosis in the rat heart and soleus muscle. , Liverpool v. 98, n. 4, p. 1379-1386, dec. 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15591297> >. Acessado em 20/03/2012.

CABASSI, A. *et al.* Sympathetic activation in adipose tissue and skeletal muscle of hypertensive rats. **Hypertension**, Parma, v. 39, n. 2 Pt 2, p. 656-661, feb. 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11882626> >. Acessado em 27/03/2012.

CHEN, C. Y.; BONHAM, A. C. Postexercise hypotension: central mechanisms. **Exercise sport of Science**, Davis, v. 38, n. 3, p. 122-127, july 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20577060> >. Acessado em 07/03/2012.

CHOBANIAN, A. V. *et al.* Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, Dallas v. 42, n. 6, p. 1206-1252, dec. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14656957> >. Acessado em 27/03/2012.

DIEZ, J. *et al.* Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, Boston, v. 30, n. 5, p. 1029-1034, nov. 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9369251> >. Acessado em 27/03/2012.

DINENNO, F. A. *et al.* Regular endurance exercise induces expansive arterial remodelling in the trained limbs of healthy men. **Journal of Physiology**, Boulder, v. 534, n. 1, p. 287-295, july 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11433009> >. Acessado em 20/03/2012.

FERNANDES, T. *et al.* O treinamento físico aeróbio corrige a rarefação capilar e as alterações nas proporções dos tipos de fibras muscular esquelética em ratos espontaneamente hipertensos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v.18, n. 4, p. 267-272, july-aug. 2012. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbme/v18n4/v18n4a10.pdf> >. Acessado em 21/01/2013.

FIRMO, J. O.; UCHOA, E.; LIMA, M. F. The Bambui Health and Aging Study (BHAS): factors associated with awareness of hypertension among older adults. **Caderno de saúde pública**, Belo Horizonte, v. 20, n. 2, p. 512-521, mar-apr. 2004.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073631> >. Acessado em 27/03/2012.

FITZGERALD, W. Labile hypertension and jogging: new diagnostic tool or spurious discovery? **British medical journal**, New York, v. 282, n. 62-63, p. 542-544, Feb. 1981.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6780119> >. Acessado em 07/03/2012.

FORTUNO, M. A. *et al.* Clinical implications of apoptosis in hypertensive heart disease. **Heart circulatory physiology**, Pamplona, v. 284, n. 5, p. 495-506, may 2003.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12679323> >. Acessado em 05/03/2012.

FORTUNO, M. A. *et al.* Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT1 blockade with losartan.

Hypertension, Pamplona, v. 32, n. 2, p. 280-286, aug. 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9719055> >. Acessado em 05/03/2012.

GAVA, N. S. *et al.* Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 1129-1133, dec. 1995.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7498982> >. Acessado em 05/03/2012.

GOLDSPINK, D. F. *et al.* Catecholamine-induced apoptosis and necrosis in cardiac and skeletal myocytes of the rat in vivo: the same or separate death pathways? **Experimental physiology**, Liverpool, v. 89, n. 4, p. 407-416, july 2004.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15131072> >. Acessado em 23/03/2012.

GRAY, S. D.; CARLSEN, R. C.; DENG, J. Soleus muscle contractile properties in hypertensive rats. **American journal of physiology**, Davis, v. 267, n. 3, p. 735-739, sept. 1994.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8092317> >. Acessado em 23/03/2012.

GUO, Q. *et al.* Effects of estradiol, angiotensin-converting enzyme inhibitor and exercise training on exercise capacity and skeletal muscle in old female rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, Sendai, v. 32, n. 2, p. 76-83, jan. 2010.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20374181> >. Acessado em 27/03/2012.

HAGBERG, J. M. *et al.* Effect of exercise training on the blood pressure and hemodynamic features of hypertensive adolescents. **American journal of cardiology**, St. Louis, v. 52, n. 7, p. 763-768, oct. 1 1983.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6624669> >. Acessado em 27/03/2012.

HAGBERG, J. M.; PARK, J. J.; BROWN, M. D. The role of exercise training in the treatment of hypertension: an update. **Sports Medicine**, College Park, v. 30, n. 3, p. 193-206, sept. 2000.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10999423> >. Acessado em 23/03/2012.

HAMILTON, B. M. **Fisiopatologia**. LAB: São Paulo, 2007.

HASKELL, W. L. *et al.* Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Circulation**, Stanford, v. 116, n. 9, p. 1081-1093, aug. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671237> >. Acessado em 23/03/2012.

HERNANDEZ, N. *et al.* Morphological alterations in skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. **Instituto de Investigación Clínica**, Caracas, v. 49, n. 1, p. 79-91, mar. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18524334> >. Acessado em 13/03/2012.

HIGASHI, Y. *et al.* Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects: role of endothelium-derived nitric oxide. **Circulation**, Westerville, v. 100, n. 11, p. 1194-1202, sept. 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484540> >. Acessado em 05/03/2012.

HORTA, M. F. Y. Quando a célula programa a própria morte. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 25, n. 150, p. 39-45, june 1999. Disponível em: < <http://www.dbm.ufpb.br/~marques/Artigos/Apoptose.pdf> > Acessado em: 23/03/2012.

KENNEY, M. J. S. Postexercise hypotension. Key features, mechanisms, and clinical significance. **Hypertension**, Davis, p. 653-664, july 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8225525>>. Acessado em 13/03/2012.

KOBAYASHI, N.; DELANO, F. A.; SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Oxidative stress promotes endothelial cell apoptosis and loss of microvessels in the spontaneously hypertensive rats. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, San Diego, v. 25, n. 10, p. 2114-2121, oct. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16037565> >. Acessado em 08/03/2012.

KOKKINOS, P. F. *et al.* Effects of regular exercise on blood pressure and left ventricular hypertrophy in African-American men with severe hypertension. **New england journal of medicine**, Massachusetts, v. 333, n. 22, p. 1462-1467, nov. 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7477146> >. Acessado em 08/03/2012.

KUMAR, V. A. *et al.* **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 7ª. Rio de Janeiro: Elsevier 2005.

LATERZA, M. C. *et al.* Exercise training restores baroreflex sensitivity in never-treated hypertensive patients. **Journal of Hypertension**, São Paulo, v. 49, n. 6, p. 1298-1306, jun. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17438307> >. Acessado em 08/03/2012.

LEE, M. C.; WEE, G. R.; KIM, J. H. Apoptosis of skeletal muscle on steroid-induced myopathy in rats. **Journal of Nutritional**, Gwangju, v. 135, n. 7, p. 1806-1808, july 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987869> >. Acessado em 13/03/2012.

LIN, Y.; HORVATH, S.M. Automatic nervous control of cardiac frequency in the exercise-trained rat. **Journal Applied Physiology**. Santa Barbara, v. 33, n. 6, p. 796-799, dec. 1972. Disponível em: < <http://0-jap.physiology.org.library.pcc.edu/content/33/6/796.extract> >. Acessado em 23/01/2013.

LIRA, F. S. *et al.* Exercise training improves sleep pattern and metabolic profile in elderly people in a time-dependent manner. **Lipids Health Disease**, São Paulo, v. 10, p. 1-6, july 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21733182> >. Acessado em 13/03/2012.

MAKINO, N. *et al.* Chronic antisense therapy for angiotensinogen on cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Cardiovasc Research**, Beppu, v. 44, n. 3, p. 543-548, dec. 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10690286> >. Acessado em 13/03/2012.

MCCULLAGH, P. E.; NELDER, J. A. **Generalizes Linear Models**. 2ª ed. Chapman:Londres, 1989.

McMILLAN, E.M. *et al.* Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of treadmill training. **Journal of Applied Physiology**. Waterloo, v. 113, n. 7, 113, n. 7, p. 1048-1057, oct, 2012. Disponível em: < <http://jap.physiology.org/content/113/7/1048.full> >. Acessado em 24/01/2013.

MELO, R.P., MARTINHO Jr, E., MICHELINI, L.C. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. **Journal of Hypertension**, v. 42, n. 2, p. 851-857, aug, 2003. Disponível em: < <http://hyper.ahajournals.org/content/42/4/851.full.pdf+html> >. Acessado em: 23/01/2013.

MONTEIRO, H. L. R.; SQUINCA, D. A. *et al.* Efetividade de um programa de exercícios no condicionamento físico, perfil metabólico e pressão arterial de pacientes hipertensos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. Bauru v.13, n. 1, p.107-112 mar- apr. 2007. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbme/v13n2/08.pdf> > Acessado em 27/03/2012.
n. 2, p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. . Institute for Laboratory Animal Research. Washington, D.C. 1996

NEGRÃO, C.E.; MOREIRA, E.D.; Santos, M.C.L.M.; FARAH, V.A.M.; KRIEGER, E.M. Vagal function impairment after exercise training. **Journal Applied Physiology**. São Paulo v. 72, n. 5, p. 1749-1753, may. 1992. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1601782> > Acessado em: 23/01/2013.

NEGRÃO, C.E.; RONDON, M.U.P.B. Exercício físico, hipertensão e controle barorreflexo na pressão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**. v. 8, n. 1, p. 89-95 jan-mar. 2001. Disponível em: < <http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/8-1/010.pdf> > Acessado em 23/01/2013.

NEGRÃO, C.E.; BARRETTO, A.C.P. **Cardiologia do Exercício**. 3ª ed. São Paulo: Manole, 2010.

Neter, J. *et al.* **Applied linear statistical models**. 4ª ed. Chicago: Irwin, 1996.

OVERTON, J. M.; JOYNER, M. J.; TIPTON, C. M. Reductions in blood pressure after acute exercise by hypertensive rats. **Journal Applied of physiology**, Quebec, v. 64, n. 2, p. 748-752, feb. 1988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3372431> >. Acessado em 08/03/2012.

PINTO, S. L. *et al.* Prevalence of pre-hypertension and arterial hypertension and evaluation of associated factors in children and adolescents in public schools in Salvador, Bahia State, Brazil. **Caderno de saúde pública**, Salvador, v. 27, n. 6, p. 1065-1075, june 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21710004> >. Acessado em 15/03/2012.

QUADRILATERO, J.; RUSH, J. W. Increased DNA fragmentation and altered apoptotic protein levels in skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. **Journal applied of physiology**, Waterloo, v. 101, n. 4, p. 1149-1161, oct. 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16778006> >. Acessado em 15/03/2012.

QUADRILATERO, J.; RUSH, J. Evidence for a pro-apoptotic phenotype in skeletal muscle of hypertensive rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Waterloo, v. 368, n. 1, p. 168-174, mar. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18211807> >. Acessado em 09/03/2012.

QUADRILATERO, J.; ALWAY, S. E.; DUPONT-VERSTEEGDEN, E. E. Skeletal muscle apoptotic response to physical activity: potential mechanisms for protection. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, Waterloo, v. 36, n. 5, p. 608-617, oct. 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21936642> >. Acessado em 13/03/2012.

RAVASSA, S. *et al.* Mechanisms of increased susceptibility to angiotensin II-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, Pamplona, v. 36, n. 6, p. 1065-71, dec. 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11116126> >. Acessado em 28/03/2012.

RODRIGUEZ-FEO, J. A. *et al.* Doxazosin modifies Bcl-2 and Bax protein expression in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, Madrid, v. 18, n. 3, p. 307-315, mar. 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10726718> >. Acessado em 15/03/2012.

RODRIGUEZ-LOPEZ, A. M. *et al.* Increased apoptosis susceptibility in mesangial cells from spontaneously hypertensive rats. **Microvascular Research**, Salamanca, v. 59, n. 1, p. 80-87, jan. 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10625574> >. Acessado em 15/03/2012.

SCHLUTER, K. D.; SCHRECKENBERG, R.; REBELO, R. M. C. Interaction between exercise and hypertension in spontaneously hypertensive rats: a meta-analysis of experimental studies. **Hypertension resesarch**, Giessen, v.33, n.11, p. 1155-1161, nov. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20720553> >. Acessado em 28/03/2012.

SHARIFI, A. M.; SCHIFFRIN, E. L. Apoptosis in vasculature of spontaneously hypertensive rats: effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor and a calcium channel antagonist.

American journal of hypertension, Quebec, v. 11, n. 9, p. 1108-1116, sept. 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9752897> >. Acessado em 28/03/2012.

SHARMAN, J. E.; STOWASSER, M. Australian association for exercise and sports science position statement on exercise and hypertension. **Journal of Science and Medicine in Sport**, Queensland, v. 12, n. 2, p. 252-257, mar. 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19147407> >. Acessado em 09/03/2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 95, n.1, p. 1-51, 2010.

SONG, Y. H. *et al.* Muscle-specific expression of IGF-1 blocks angiotensin II-induced skeletal muscle wasting. **The Journal Of clinical investigation**, Galveston, v. 115, n. 2, p. 451-458, feb. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15650772> >. Acessado em 09/03/2012.

SONG, W.; KWAK, H.; LAWLER, J.M. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. **Antioxidants e Redox Signaling**, San Antonio, v. 8, n. 3, p. 517-528, apr. 2006. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16677096>>. Acessado em 24/01/2013.

SOWERS, J. *et al.* Plasma aldosterone and corticosterone responses to adrenocorticotropin, angiotensin, potassium, and stress in spontaneously hypertensive rats. **Endocrinology**, Sepulveda, v. 108, n. 4, p. 1216-1221, apr. 1981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6258898> >. Acessado em 15/03/2012.

SUGANO, M. *et al.* Reduction of plasma angiotensin II to normal levels by antisense oligodeoxynucleotides against liver angiotensinogen cannot completely attenuate vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, Oita, v. 18, n. 6, p. 725-731, june 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10872557> >. Acessado em 28/03/2012.

SUZUKI, H. *et al.* Enhanced DNA fragmentation in the thymus of spontaneously hypertensive rats. **American journal of physiology**, Tokyo, v. 276, n. 6, p. 2135-2140, june 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10362697> >. Acessado em 09/03/2012.

TICE, R. R. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, North Carolina, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737956> >. Acessado em 15/03/2012.

THOMAS, J. R.; NELSON, J.K. **Research methods in physical activity**. 3ªed. Champaign : Human Kinetics, 1996.

UNITED STATES. **Committee on Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research**. Washington, D.C. 2003

VEGA, F. *et al.* Susceptibility to apoptosis measured by MYC, BCL-2, and BAX expression in arterioles and capillaries of adult spontaneously hypertensive rats. **Journal of**

Hypertension, Pamplona, v. 12, n. 8, p. 815-820, aug. 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10480475> >. Acessado em 09/03/2012.

VÉRAS-SILVA, A.S. *et al.* Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. **American Journal Physiology**, São Paulo, v, 273, n.6, p. 2627-2631, Aug. 1997.

ANEXOS

Anexo - A



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 25 de abril de 2012

CEP Nº **1576/11**

CONEP Nº:

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): Luiz Henrique Soares de Andrade

Disciplina/Departamento: Exercício Físico e doenças crônicas II

Título do estudo: Efeito do treinamento físico aeróbico na hipertrofia cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos: papel do sistema ubiquitina proteassoma

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU E APROVOU o(a) Emenda ao projeto (versão 1 de 28/mar/2012), incorporando nova metodologia do projeto de pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Anexo – B



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 27 de outubro de 2011
CEP Nº: 1576/11

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): Luiz Henrique Soares de Andrade

Disciplina/Departamento: Exercício Físico e doenças crônicas II

Pesquisadores associados: Alessandra Medeiros (orientadora)

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

TÍTULO DO ESTUDO: Efeito do treinamento físico aeróbico na hipertrofia cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos: papel do sistema ubiquitina proteassoma :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria C - estudo crônico

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVO DO ESTUDO: Estudar o efeito do treinamento físico aeróbico na hipertrofia cardíaca observada nos ratos espontaneamente hipertensos e na atividade do Sistema Ubiquitina Proteassoma.

RESUMO: Estudo com ratos Wistar e ratos SHR, machos, com 8 semanas. Anestésico: ketamina e xilazina. Eutanásia: decapitação. Os ratos serão distribuídos em quatro grupos: ratos wistar sedentários (n=8), ratos wistar treinados (n=8), ratos SHR sedentários (n=8) e ratos SHR treinados (n=8). Uma parte dos animais de ambos os grupos (Wistar e SHR) serão submetidos ao protocolo de treinamento físico em esteira rolante após a realização da determinação do consumo de oxigênio de pico (VO2pico). Na primeira semana do treinamento físico, os ratos treinarão em 30 % do VO2 pico, durante 30 minutos. Nas três semanas seguintes, o tempo de duração será de 40, 50 e 60 minutos, respectivamente, mantendo o consumo de 30% do VO2 pico. A partir da quinta semana manteremos o tempo de duração do treinamento, aumentando o consumo de oxigênio para 30, 40, 50, 55% do VO2pico, repetindo este último valor nas duas semanas seguintes. A determinação do VO2pico será realizado também na metade do tempo de treinamento para ajustar a intensidade do treinamento. Será determinada a Capacidade Aeróbia - Medida do Consumo de Oxigênio; Avaliação da tolerância ao esforço físico progressivo, que consiste na prática da corrida durante 10 minutos, utilizando velocidades variadas, por três dias alternados. Serão realizados: registro indireto da pressão arterial caudal e frequência cardíaca, avaliação da função sistólica e diastólica por meio de ecocardiograma, avaliação da função ventricular esquerda em condições basais, avaliação da função ventricular esquerda durante sobrecarga súbita de pressão, Estudo da contratilidade miocárdica "in vitro". Os animais que serão utilizados para realização das análises histológicas no coração e para estudo da atividade do sistema ubiquitina proteassoma não serão submetidos a avaliação da função ventricular. Os animais serão sacrificados, o coração retirado e preparados cortes histológicos para determinação do diâmetro dos cardiomiócitos e quantidade de colágeno cardíaco. Será realizada avaliação da expressão gênica de componentes do sistema ubiquitina-proteassoma no músculo cardíaco através da expressão gênica de MURF1, Atrogin1, e das subunidades C2 (subunidade α) e C5 (subunidade β) do proteassoma no músculo cardíaco. Para avaliação da atividade do NFkB no músculo cardíaco, será realizado "Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)". Para verificar se os ratos SHR apresentam estresse oxidativo no músculo cardíaco, e avaliar o efeito do treinamento físico nesta variável, será avaliado o estado redox do par glutatona reduzida (GSH)/glutatona oxidada (GSSG) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detecção eletroquímica.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Pouco se sabe sobre o impacto do treinamento físico no sistema ubiquitina-proteossoma (SUP), o qual é um dos principais reguladores do metabolismo protéico. As pesquisas são escassas nessa área, especialmente as correlacionadas ao sistema cardiovascular. No entanto, estudos epidemiológicos têm demonstrado a importância da atividade física na redução do risco de doenças cardiovasculares. O exercício aeróbio regular (crônico) pode promover uma série de adaptações benéficas ao organismo, incluindo a melhora da função endotelial em modelos animais de hipertensão, e em pacientes hipertensos, além de mudanças benéficas na pressão arterial, frequência cardíaca, metabolismos lipídico e glicolítico, fatores neuro-hormonais, massa corporal e defesas antioxidantes. Assim, podendo reverter ou atenuar o processo de remodelamento cardíaco patológico.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo, tendo sido aprovado no Núcleo de Bioética da Baixada Santista. De acordo com as respostas às pendências emitidas pelo CEP, o pesquisador informa que não haverá utilização de material radiativo (P32) na avaliação da atividade do NFkB e não haverá dosagens no Laboratório do InCor, como havia sido descrito inicialmente no projeto apresentado.

TCLE: Não se aplica

DETALHAMENTO FINANCEIRO: CNPq-Edital Universal - R\$ 1635,00 . Serão utilizados recursos de um projeto temático da FAPESP.

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 24 meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 21/10/2012 e 16/10/2013



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo